

B4**HEGF VECTOR AND THE PREPARATION PROCESS OF HEGF**

Patent number: KR9606121
Publication date: 1996-05-09
Inventor: LEE KANG-MOON (KR); NOH KYU-SEUNG (KR); KWON CHANG-HYUK (KR); PARK SEUNG-KOOK (KR); YU YOUNG-HYO (KR); JI YOUNG-SOO (KR)
Applicant: DAEWOONG PHARM CO LTD (KR)
Classification:
- **international:** C12N15/12; C12N15/70
- **european:**
Application number: KR19930006979 19930426
Priority number(s): KR19930006979 19930426

Report a data error here**Abstract of KR9606121**

The invention is a method of preparing a new hEGF expression vector for mass production of hEGF. The expression vector is pTE105. The pTE105 is prepared by including cassette inserted with gene for coding hEGF between Omp leading sequence and universal translation termination in Omp A leading sequence - universal translation termination sequence - trp A transcription termination sequence. The cassette is made for control of translation by tac promoter. The tac promoter has two ribosome binding site, so the commencement of protein translation is accomplished effectively. The hEGF expression vector permits to produce hEGF continuously and stably.

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

Best Available Copy

공고특허특1996-0006121

(19)대한민국특허청(KR)
(12) 특허공보(B1)(51) Int. Cl. 6
C12N 15/12
C12N 15/70(45) 공고일자 1996년05월09일
(11) 공고번호 특1996-0006121
(24) 등록일자

(21) 출원번호	특1993-0006979	(65) 공개번호	특1994-0024067
(22) 출원일자	1993년04월26일	(43) 공개일자	1994년11월18일
(73) 특허권자	주식회사대웅제약 이승철 경기도 성남시 중원구 상대원동 223-23		
(72) 발명자	이강문 서울특별시 강동구 천호 4동 438-17 노규승 서울특별시 성북구 길음 3동 25-1 권창혁 서울특별시 송파구 잠실 6동 장미아파트 26동 307호 박승국 경기도 성남시 중원구 상대원 1동 산호아파트 409호 지영수 서울특별시 서초구 양재동 우성아파트 112동 1005호 유영효 경기도 부천시 소사 3동 한신아파트 106동 104호		
(74) 대리인	이한영		

심사관 : 김형준 (책자공보 제4454호)

(54) 인간 상피세포 성장인자(hEGF) 발현벡터 및 그를 이용한 hEGF의 제조방법

요약

내용 없음

대표도

도1

명세서

[발명의 명칭]인간 상피세포 성장인자(hEGF) 발현벡터 및 그를 이용한 hEGF의 제조방법 [도면의 간단한 설명]제1도는 "Omp A 선도서열-보편적 번역 정지서열-trp A 전사 정지서열"의 올리고 뉴클레오타이드를 나타낸다.

제2도는 플라스미드 벡터 pDT 420의 제조과정을 도식화한 것이다.

제3도는 플라스미드 벡터 pDE 135의 제조과정을 도식화한 것이다.

제4도는 플라스미드 벡터 pTC 108의 제조과정을 도식화한 것이다.

제5도는 플라스미드 벡터 pTC 226의 제조과정을 도식화한 것이다.

제6도는 플라스미드 벡터 pTE 105의 제조과정을 도식화한 것이다.

제7도는 인간 상피세포 성장인자 발현벡터 pTE 105로 형질전환된 대장균 JM 101로부터 발현된 인간상피세포 성장인자를 (A) SDS-PAGE와 (B) 웨스턴 블로팅을 통하여 확인한 사진이다.

[발명의 상세한 설명]본 발명은 인간 상피세포 성장인자(human epidermal growth factor, 이하 "hEGF"라 함) 발현벡터 및 그를 이용한 hEGF의 제조방법에 관한 것이다. 좀 더 구체적으로, 본 발명은 대장균에서 hEGF의 대량발현이 가능하도록 설계되고 인위적으로 합성된 hEGF 유전자를 역시 대장균내에서 단백질의 발현을 효율적으로 하도록 고안된 발현벡터에 삽입하여 제조된 hEGF 발현벡터, 형질전환체 및 그로부터 hEGF를 제조하는 방법에 관한 것이다.

hEGF는 53개의 아미노산으로 구성되어 있고 3개의 이황화물(disulfide) 결합을 가지는 폴리 펩타이드(Cohen, S. (1962) J. Bio1. Chem. 237, 1555-1562; Savage, C.R., (1972) J. Bio1. Chem. 247, 7612-7621)로, 포유류의 세포, 특히 상피 및 피부세포의 성장과 분화(Sporn, M.B. et al., (1985) Nature(London) 313, 745-747; Sporn M.B. et al., (1980) N. Engl. J. Med. 303, 878-880) 및 상처의 치료(Buckley, A. et al., (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 82, 7340-7344) 등의 분자수준에서의 조절에 매우 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다.

또한, hEGF는 상피세포의 분화촉진 능력과는 별도로 위장관내에서 위산의 분비 억제 능력도 나타내고 있어, 위궤양 등의 질병치료에도 매우 유용하게 응용될 수 있는 것으로 보고되고 있다(Gregory, H., (1985) J. Cell Sci. Suppl.3,11-17).

한편, 1975년 스타키(starkey) 등이 인간의 뇨에서 hEGF를 분리 정제하고 그 성질을 규명한 이래로, hEGF를 고수율로 얻으려는 노력은 계속되어 왔다(Starkey, R.H. et al., (1975) Science 189, 800; Cohen, S. et al., (1975) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72,1317). 이러한 노력의 하나로 몇몇 연구그룹들은 유전공학 기술을 이용하여 hEGF 유전자를 클로닝하는데 성공한 것으로 보고하고 있으나(Smith, J. et al., (1982) Nucleic Acids Res. 10, 4467-4482; Urdea, M.S et al.,(1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 7461-7465; Oka, T, et al., (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 7212-7216), 이러한 유전공학 기술을 이용하여 제조된 hEGF는 산업적으로 이용가능할 만큼 충분한 양 또는 충분한 활성을 나타내지 못하는 결정적 문제점이 있었다.

따라서, 이러한 당면문제를 해결하기 위하여, 특정 숙주에서 hEGF를 고수율로 발현시킬 수 있는 가장이상적인 뉴클레오티드 및 발현 조절서열을 포함하는 발현벡터를 제조하기 위한 많은 노력이 기울어져 왔다.

이에, 본 발명의 발명자들은 산업적으로 이용가능할 정도로 충분한 양의 hEGF를 제공하기 위한 연구노력을 계속한 결과, 대장균에서 hEGF를 고수율로 생산하는데 저해가 될 수 있는 요인들을 최소화하여 hEGF를 높은 수율로 제조하며, 동시에 hEGF 유전자를 이용한 유전자 조작 실험에 매우 유용한 인위적으로 설계되고 화학 합성된 hEGF 유전자를 개발하는데 성공한 바 있으며, 이러한 연구결과는 본 출원과 동일자 출원되는 본 출원인의 「신규한 인간 상피세포 성장인자」(대한민국 특허출원 제93- 호)에 개시되어 있다.

본 발명에서는 생리적으로 활성을 나타내는 hEGF가 대장균내에서 고수율로 생산되도록 하기 위하여, 천연의 hEGF와 동일한 아미노산을 암호화하며 대장균에서 가장 빈번히 사용되는 코돈(Grantham et al.,(1981) Nucleic Acids Res.9,243-274)으로 기존의 hEGF 뉴클레오티드 서열을 대체하였으며, 동시에 전술한 본 출원인의 인간 상피세포 성장인자 유전자를 본 발명의 신규한 발현벡터에 삽입한 결과, 놀라움게도 hEGF를 고수율로 안정적이며 지속적으로, 또한 조절가능하도록 제조할 수 있는 것을 발견하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

이하, 본 발명을 구체적으로 설명하고자 한다.

단백질의 대량생산에 있어서 미생물의 생장시기에 따른 발현의 적절한 조절이 매우 중요하다는 것은 이미 주지의 사실인 바, 본 발명의 발현벡터는 그 내부에 tac 프로모터(de Boer et al.(1983) DNA 2, 231-235; Anmnn et al. (1983) Gene 25, 167-178)를 도입하여 손쉽게 단백질의 발현을 조절할 수 있도록 하였다. 한편, 본 발명의 tac 프로모터는 그 하단에 연속되는 두개의 리보솜 결합부위(ribosome binding site; Shine and Dalgarno(1974) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71, 1342)를 가지므로, 단백질의 번역개시를 보다 효율적으로 수행하는데 매우 유리하도록 구성되어 있다.

아울러, 본 발명의 발현벡터는 다음과 같은 서열들을 포함하여 단백질이 정확하고 효율적으로 발현되며, 또한 발현된 단백질이 세포외부로 분비될 수 있도록 하였다: (1) 인위적으로 합성된 Omp A 선도서열(von Gabain, A. et al (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 653-657) ; (2) 보편적 번역정지서열(universal translation termination sequence; P. Singleton and D. Sainsbury, (1987) Dictionary of Microbiology and Molecular Biology, 2nd Ed., Wiley, 383);, 및 (3) trp A 전사 정지서열(transcription termination sequence; Christie, G. E. et al. (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78,4180). 아울러, 본 발명의 벡터는 그 내부에 파 부위(par site; Austin and Abeles(1983) J. Mol. Biol.

169,373-387)를 가지도록 설계되어 벡터가 대장균내에서 안정하게 유지될 수 있도록 하였다.

한편, 대장균의 발현벡터에 일반적으로 이용되는 엠피실린 내성 마커(ampicillin-resistant marker)는 분비되는 단백질인 베타락타마제(β -lactamase)를 코딩하고 있어, 원하는 유전자를 발현하여 분비시키고자 할 때 세포의 단백질 분비기작에 두 단백질이 경쟁적으로 작용하여 실제 원하는 유전자에 의하여 발현된 단백질의 분비량이 감소되는 것이 일반적으로 알려져 있다 (A. Oka, et al., (1981) J. Mol. Biol. 147, 217). 따라서 본 발명의 벡터에서는 분비되는 단백질이 아닌 세포 내부에 존재하는 단백질을 코딩하는 테트라사이클린 내성 마커(tetracycline-resistant marker)를 사용하여 단백질 분비과정에서의 경쟁을 피하여 원하는 단백질의 분비량이 증가될 수 있도록 하였다.

이와같은 여러가지 측면을 고려하여 볼 때, 본 발명의 벡터는 대장균내에서 매우 안정하며, 유용한 단백질을 대장균에서 고수율로 조절가능하도록 생산하는데 유리하게 구성되어 있다. 따라서, 본 발명은 절술한 본발명의 출원인이 설계하여 인위적으로 합성된 hEGF 유전자를 전술한 벡터, 즉 단백질의 발현과 세포외부로의 분비를 극대화시키는 발현조절 서열로 구성되어 있고, 대장균내에서 안정하게 유지되며, hEGF의 발현을 인위적으로 조절할 수 있는 프로모터를 포함한 벡터계에 도입하여, 산업적으로 이용가능할 정도의 고수율과 고효율의 hEGF를 제조하는 방법을 제공하는데 그 주된 목적이 있다.

이하, 본 발명을 첨부된 도면에 따라 좀 더 구체적으로 기술한다.

본 발명에서 합성 hEGF 유전자를 삽입하기 위한 "Omp A 선도서열-보편적 번역 정지서열-trp A 전사정지서열"은 인위적으로 고안되고 화학합성되어, 5'와 3'말단에 각각 BamH I 제한효소와 Xba I 제한효소 절단부위를 가지며 Omp A 선도서열과 보편적 번역 정지서열 사이에는 Nae I과 Pst I 제한효소 인지부위를 가지도록 제조되었다[참조 : 제1도].

합성된 "Omp A 선도서열-보편적 번역 정지서열-trp A 전사 정지서열"은 제2도에 도시된 바와 같이, 상업적으로 입수 가능한 pDR 540 플라스미드를 Pvu II 제한효소로 절단한 다음, 이 부위에 Xba I 링커를 연결하였다. 그런 다음, 다시 Xba I 제한효소로 절단하고, BamH I 제한효소로 절단하여 분리한 2.4Kb의 DNA 절편에 도입하여 제조한 벡터를 pDT 420이라고 명명하였다[참조 : 제 2 도].

pDT 420 벡터를 Nae I과 Pst I 제한효소로 절단하여 Omp A 선도서열과 보편적 번역 정지서열 사이를 절단한 후, 여기에 본 출원과 동일자 출원되는 「신규한 인간 상피세포 성장인자 유전자」(대한민국 특허출원 제93- 호)에 기술된 인간 상피세포 성장인자 유전자를 함유하는 벡터 pUE 118을 Hpa I 및 Pst I 제한효소로 이중 절단하여 분리한 합성 hEGF 유전자 서열을, T₄ DNA 연결효소를 이용, 결합시켜 hEGF 발현 카세트를 완성하였다. 이와 같이 제조된 pUE 118 유래의 hEGF를 포함하는 pDT 420 벡터를 pDE 135라고 명명하였다[참조 : 제3 도].

한편, 공지의 플라스미드인 pUC 19(Yanisch-Perron, C. et al., (1985) Gene 33, 103-119)을 Dra I 및 EcoR I으로 이중절단하여 1.2kb 크기의 평할말단과 EcoR I 제한효소 접착말단을 가지는 유전자 절편을 분리하였다. pUC 19로부터 분리한 DNA 절편과 pBR 322로부터 분리한 DNA 절편을 T

4 DNA 연결효소를 이용하여 결합시켜 테트라사이클린 내성 마커와 다중 제한효소부위 및 pUC 19 플라스미드의 복제 개시부위를 가지는 플라스미드를 제조하고 이를 pTC108이라 명명하였다[참조 : 제 4 도].

또한, 형질전환체 내에서 발현벡터를 안정화시키고 세포분열시 다음 세대로의 정확한 플라스미드 분리(partitioning)를 위해서 파 부위를 도입하기로 하였다. 이를 위하여, pTC 108을 EcoR I과 Sma I 제한효소로 절단하고, 약 2.6kb 크기의 절편을 분리하는 한편, 플라스미드 pSC 101을 Ava I 제한효소로 절단한 후, 3.3kb의 DNA 절편을 분리해냈다. 이 DNA 절편을 클레노우 단편을 이용하여 말단을 평할화시킨 후 EcoR I 링커를 연결하고, 다시 EcoR I 제한효소로 절단하였다. 이를 다시 Hinc II 제한효소로 절단하고, 0.37kb 크기의 파부위를 포함하는 DNA 절편을 분리하였다. pTC 108의 EcoR I-Sma I 제한효소절단 DNA 절편과 pSC 101에서 분리한 0.37kb 크기의 파 부위를 T

4 DNA 연결효소로 결합시켜, pTC 226 플라스미드를 제조하였다[참조 : 제 5 도]. pTC 226 플라스미드는 테트라사이클린 내성 마커와 복제 기원(replication origin)을 포함하고 파 부위를 가지므로 대장균내에서 안정하게 유지될 수 있다.

pTC 226을 Afl III 제한효소로 절단한 후 클레노우 단편을 이용하여 말단을 수식하고, 이를 다시 Xba I 제한효소로 절단하고 2.5kb 크기의 DNA 절편을 분리하였다. 이 2.5kb DNA 절편에 결합시킬 hEGF 발현 카세트는 pDE 135 플라스미드를 Hind III 제한효소를 이용하여 절단하고 클레노우 단편으로 말단을 수식한 후, 다시 Xba I 제한효소로 절단하여 얻어냈다. 이들 두 절편을 T

⁴ DNA 연결효소를 이용하여 결합시키고, 최종적으로 제조된 플라스미드를 pTE I05라고 명명하였다[참조 : 제 6 도]. pTE I05를 대장균JM I01 (Escherichia coli JM I01)에 형질전환시키고, 이를 DW/BT-2024로 명명하였으며, DW/BT-2024는 1993년 4월 9일 국제기탁기관인 한국중균협회(KCCM)에 기탁번호 KCCM-10027으로 기탁되었다.

LB 배지에서 배양한 DW/BT-2042에서의 hEGF의 발현은 15% SDS-PAGE와 웨스턴 블로팅을 통하여 확인되었다[참조 : 제 7 도]. 발현된 hEGF양의 정량은 hEGF(Amersham, ARN 5100, UK)를 표준물질로하여 A 431 세포주(ATCC CRL 1555)를 이용하여 전술한 수용체 결합분석법을 통하여 실시하였으며, 그결과 배양 30시간 후에 343mg/L의 hEGF가 생성되고, 이들 중 대부분이 배양액으로 방출되는 것을 확인하였다.

이하, 실시예에 의하여 본 발명을 보다 구체적으로 설명하고자 한다.

이들 실시예에는 본 발명을 오로지 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 국한되는 것이 아니라는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

(실시에 1) 선도, 번역 및 전사 정지서열의 합성은 발명의 벡터에 삽입될 Omp A 선도서열, 보편적 번역 정지서열과 trp A 전사 정지서열은 적절한 제한효소 부위를 가지도록 설계하여 인위적으로 합성하였으며, 그 서열은 제1도에 나타내었다. 본 발명의 합성 올리고 뉴클레오타이드는 5' 말단에는 BamH I 제한효소 절단부위를 가지며, 3' 말단에는 Xba I 제한효소 절단부위를 가진다. 그리고 Omp A 선도서열과 보편적 번역 정지서열 사이에는 Nae I과 Pst I 제한효소 부위를 가지도록 설계하여 발현시키고자 하는 유전자가 추가되는 아미노산 없이 정확히 자연형과 동일한 N말단 아미노산을 가질 수 있도록 합성하였다.

본 발명의 "Omp A 선도서열-모판적 번역 정지서열-trp A 전사 정지서열"은 31 또는 32머(mer)의 길이를 가지는 다 음과 같은 8개의 올리고 뉴클레오티드로 나누어 합성하였다.

CT: S GATCCAAATTATGAAAAGAGAGCTAATGGCT

CU: 5 GATTGAGTGGGACTGGCTGGTTTCCTAC

CS: 5 GTAGCCGAGCCCGCCCTCCAGTTAATTATT ?

C4: 5' AAGCAGCCCGCCTAATGAGCGGCTTTTTTTT

NI: 5 CTAGAAAAAAGCCCGTCATTAGGCGGGCTT

N2: 5' GCTTAATTAATTAAGCTGCAGGCCGGCCTGCG 3'

N3: 5' CTACGGTAGCGAAACCAGCCAGTGCCACTGC 3'

5' AATCGCGATAGCTGTCTTTTTCATAATTTTG 3'

상기 서열의 합성은 고상 포스파이트 트리에스테르 합성법(Narang, S. A. "Synthesis and Applications of DNA and RNA"(1987), Academic Press)을 이용한 올리고 뉴클레오티드는 자동화된 뉴클레오티드 합성기기 (Pharmacia LKB Biotechnology, Uppsala, Sweden) 를 이용하여 합성 하였다.

합성이 완료된 올리고 뉴클레오타이드는 실리카에 부착된 채로 TTD(티오폴/트리에틸아민/디옥산=1/2/2) 용액을 처리하고 에탄올과 에탄올로 충분히 세척한 후 강 암모니아수를 처리하여, 실리카 매트릭스로부터 합성 올리고 뉴클레오타이드를 떼어냈다. 올리고 뉴클레오타이드 용액에 추가로 강 암모니아수를 가하고 50℃에서 12시간 유지하여 보호잔기(protecting group)를 제거시키고, 반응후 가스제거와 함께 용액을 0.5m1가 될 때까지 감압농축하였다. 농축된 올리고 뉴클레오타이드는 SEP-PAK 카트리지(Waters Inc., MA,USA)를 이용하여 아세토니트릴/트리에틸아민 완충액으로 일차 정제한 후, 15% 폴리 아크릴아마이드 겔에서 전기영동을 수행하였다. 그런 다음, 해당 올리고 뉴클레오타이드 부위를 잘라내고 25mM 트리에틸아민 완충액을 이용하여 이를 추출하였다. 추출된 올리고 뉴클레오타이드 용액은 SEP-PAK을 이용한 아세토니트릴/트리에틸아민 완충액으로 염을 제거하여 최종 정제하였다. 정제된 각각의 올리고 뉴클레오타이드는 T

⁴ 폴라 뉴클레오티드 키나제(New England Biolabs, #201S)를 사용하여 γ - ^{32}P -ATP로 표지후 막삼-길버트 서열 분석(Maxam, A M. & Gilbert, W. (1977). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74,560-564)을 수행하여 각 올리고 뉴클레오티드 서열을 확인하였다.

에펜돌프(Eppendorf) 시험관에 5' 말단에 인산기가 부착된 각각의 올리고 뉴클레오타이드 100pmole과 트리스-염산 (pH 7.5, 0.1M) 40u1를 가하고 100℃에서 3분간 변성시킨 후, 수조 내에서 온도를 상온으로 서서히 내리면서 올리고 뉴클레오타이드들을 재결합시켰다. 연결 효소 완충용액과 T

4 DNA 연결 효소(NewEngland Biolabs, #202S) 10단위를 가하고 4℃에서 12시간 반응시켰다. 연결 효소 완충용액과 T

4 DNA 연결 효소 10단위를 더 가하고 상온에서 3시간 더 반응시킨 후, 7% 폴리아크릴아마이드 젤 전기영동을 진행하고 방사선 사진(autoradiography)을 만들어서 유전자의 조립을 확인하였다.

(실시에 2) 플라스미드 pDT 420의 제조 플라스미드 pDR 540(McKenney, K. et al., (1981) in Gene Amplification and Analysis. Vol II, Elsevier, 383; Pharmacia LKB Biotechnology, #27-4928-01, Upssala, Sweden)을 Pvu II 제한 효소(New England Biolabs, # 1031, MA, USA: 이후 기술되는 모든 제한 효소와 링커는 New England Biolabs로부터 입수함)로 절단한 후, Xba I 링커(#1032)를 결합시켰다. 그런 다음, Xba I 제한 효소(#145S)로 절단하여 Xba I 제한 효소 절단 부위를 도입하였다. 이를 다시 BamH I 제한 효소(# 136S)로 절단하고 전기영동한 후 GeneClean II DNA 용출 키트(BIO 101 Inc., CA, USA)를 사용하여 2.4kb의 DNA 절편을 분리해 내었다. 2.4kb DNA 절편에 실시에 1에서 합성한 "Omp A 선도서열-보편적인 번역 -trp A 전사 정지서열" 절편을 T

4 DNA 연결 효소(#202S)를 이용하여 연결하고 대장균 JM 101에 하나한(Hanaban, D.)의 방법(DNA Cloning Vol. I: a practical approach, IRL Press, (1985), 109-135)에 따라 형질 전환시켰다. 형질 전환체로부터 재조합 플라스미드를 분리한 후 막삼-길버트 법에 의하여 염기서열 분석을 수행하여 처음 고안된 "Omp A 선도서열-보편적 번역 정지서열-trp A 전사 정지서열"이 올바르게 합성되어 삽입된 재조합 플라스미드를 선별하였고, 이를 pDT 420이라 명명하였다[참조: 제 2 도].

(실시에 3) 발현 벡터 pDE 135의 제조 및 발현량의 확인 플라스미드 pDT 420을 Nae I 제한 효소(#190S)와 Pst I 제한 효소(#140S)로 처리하여 Omp A 선도서열과 보편적인 번역 정지서열 사이를 절단하였다. 본 발명의 출원인에 의해 동일자 출원인 「신규한 인간 상피세포 성장인자 유전자」(대한민국 특허출원 제93- 호)의 pUE 118 플라스미드를 Hpa I 제한 효소(#105S)와 Pst I 제한 효소로 이중 절단하여, 0.17kb의 hEGF 유전자 서열을 분리해 내었다. 분리해낸 hEGF 유전자 서열을 앞서서 Nae I 제한 효소와 Pst I 제한 효소로 절단한 pDT 420에 T

4 DNA 연결 효소를 이용하여 연결시키고 대장균 JN1 101에 형질 전환시켰다. 이때 hEGF 유전자는 Omp A 선도서열 뒤에 정확한 개방해독틀(ORF, open reading frame)을 가지도록 삽입된다. 형질 전환체로부터 재조합 플라스미드를 알카리 용해법(Sambrook et al., Molecular Cloning, a laboratory manual, 2nd Ed (1989) Cold Spring Harbor)에 의해 분리하였다. 그런 다음, Pst I과 Hind III(#104S) 효소에 의한 제한 효소 지도 확인을 통하여 처음 고안대로 Omp A 선도서열과 보편적 번역 정지서열 사이에 hEGF 유전자가 정확하게 삽입된 재조합 플라스미드를 선별하였고, 이를 pDE 135라 명명하였다[참조: 제 3 도].

pDE 135 플라스미드 벡터를 대장균(Escherichia coli) JM 101에 형질 전환시키고, LB(Luria-Bertani; Molecular Cloning/a laboratory manual, 2nd Ed.(1989) CSH) 배지에서 배양한 후 hEGF의 발현을 SDS-PAGE와 웨스턴 블로팅으로 확인하였다. hEGF의 발현량은 시판하고 있는 hEGF(Amersham, ARN 5100, UK)를 표준물질로 하여, A431 세포주(ATCC CRL 1555)를 이용한 수용체 결합 분석법(receptor binding assay; M.W. Rieman(1987) Peptides 8, 877-885)을 통하여 확인한 결과, 배양 30시간 후에 총 10mg/L의 hEGF 발현 정도를 나타내었다. 이와 같이 비교적 저조한 발현 정도를 나타낸 것은 pDE 135 플라스미드 벡터의 옴피실린 항생제 내성 마커와 hEGF 유전자의 전사 방향성의 차이 및 단백질의 생산 경쟁, 그리고 플라스미드 벡터의 형질 전환체 내에서의 불안정성 등의 문제 때문인 것으로 추정되었다. 따라서, 본 발명의 발명자들은 위의 문제점들을 해결하기 위하여, 분비되는 단백질을 베타락타마제를 만들어내는 옴피실린 항생제 내성 마커 대신, 분비되지 않고 세포 내부에 머무르는 단백질을 만드는 테트라사이클린 항생제 내성 마커를 이용하며, hEGF 발현 카세트를 장착한 신규한 벡터 시스템을 제조하기로 하였다.

(실시에 4) 플라스미드 pTC 108의 제조를 위하여, 공지의 플라스미드인 pBR 322(Bolivar, F. et al., (1977) Gene 2, 95-113)를 제한 효소 Ava I (# 152S)으로 절단한 후, 클레노우 단편(Klenow's fragment, #210S)을 이용하여 제한 효소 절단 부위를 수식하여 평할(blunt) 말단으로 만들고, 이를 다시 EcoR I 제한 효소(#101S)로 절단하고 0-8% 아가로스 겔 상에서 전기영동한 후 GeneClean II DNA 용출 키트를 이용하여 1.4kb의 DNA 절편을 분리하였다. 한편, 세포 내에서 높은 플라스미드 복제를 유지시키는 pUC 19 플라스미드의 복제 개시 부위와 복제 조절 부위 및 유전자 조작에 유리한 다중 제한 효소 부위(multiple cloning site)를 가지는 유전자 절편을 얻기 위해, pUC 19(Yanish-Perron, C., et al., (1985) Gene 33, 103-119) 플라스미드를 Dra I 제한 효소(#129S)와 EcoR I 제한 효소로 절단한 후, 역시

GeneClean II DNA 용출 키트를 이용하여 1.2kb의 DNA절편을 분리하였다. 각각 분리한 두 DNA 절편은 T

4 DNA 연결효소를 이용하여 결합시키고, 대장균 JM 101 균주에 전술한 하나한의 방법에 따라 형질전환시켰다. 형질 전환체로부터 재조합 플라스미드를 알카리 용해법에 의하여 분리하고 EcoR I과 Afl II1(#541S) 효소에 의한 제한효소 지도확인을 통해 최종선별하여, 테트라사이클린 항생제 내성 마커와 pUC 19의 다중 제한효소 부위 및 복제 개시부위를 함유하는 pTC108 플라스미드를 제조하였다[참조: 제 4 도].

(실시에 5)플라스미드 pTC 226의 제조형질전환체 내에서 발현벡터를 안정화시키고 세포분열시 다음 세대로의 정확한 플라스미드 분리를 위해서 파 부위(par site)를 도입하기로 하고, 플라스미드 pSC 101(Cohen and Chang (1973) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 70, 1293-1297; KCTC 11251)을 Ava I 제한효소(#152S)로 절단하고, 0.8% 아가로스 겔 상에서 전기영동한 후 GeneClean II DNA 용출 키트로 3.3kb의 DNA 절편을 분리하였다. 분리한 DNA 절편을 클레노우 단편으로 처리하여 제한효소 절단부위를 수식하여 평활 말단으로 만들었다. 여기에 EcoR I 링커(#1020)를 T

4 DNA 연결효소를 이용하여 연결하고 다시 EcoR I 제한효소로 처리하여 EcoR I 제한효소 절단부위를 도입하였다. EcoR I 제한효소 절단부위를 가지는 3.3kb의 DNA 절편을 다시 Hinc II제한효소(# 103S)로 처리하고 전기영동한 후, GeneClean II DNA 용출 키트를 이용하여 파(par) 부위를 포함하는 0.3kb의 DNA 절편을 분리하였다. 분리해 낸 DNA 절편을 EcoR I 제한효소와 Sma I 제한효소(# 141S)로 절단한 pTC 108 플라스미드에 T

4 DNA 연결효소를 이용하여 삽입하고 이를 대장균 JM 101균주내로 하나한의 방법에 따라 형질전환시킨 후, 알카리용해법으로 플라스미드를 분리하고 EcoR I과 PstI 효소에 의해 제한효소지도확인을 통해 파(par) 부위가 삽입된 플라스미드를 최종선별하고, 이를 pTC226이라고 명명하였다[참조: 제 5 도].

(실시에 6)발현벡터 pTE 105의 제조본 발명의 발명자들은 앞서 제조한 pDE 135 플라스미드에 존재하는 hEGF 발현 카세트를 플라스미드 pTC 226에 일정한 전사방향을 가지도록 삽입하여, 대장균 내에서 안정하게 유지되며 고수율로 hEGF를 생산할 수 있는 플라스미드 벡터를 구축하고자 하였다. 먼저, 플라스미드 pTC 226을 Afl III 제한효소로 절단한 후 클레노우 단편으로 처리하여 평활말단으로 만들었다. 이를 다시 Xba I 제한효소(# 145S)로 절단한 후 전기영동하고, GeneClean II DNA 용출 키트를 이용하여 2.5kb 크기의 DNA 절편을 분리해 내었다. 플라스미드 pDE 135를 Hind III 제한효소(#104S)로 절단한 후, 클레노우 단편을 이용하여 제한효소 절단부위를 수식하여 평활말단으로 만들었다. 이를 다시 Xba I 제한효소로 절단한 후 1% 아가로스 겔 전기영동을 하고 GeneClean II DNA 용출 키트를 이용하여 0.45kb의 DNA 절편을 분리하였다. pTC 226으로부터 분리한 2.5kb의 DNA 절편과 pDE 135로부터 분리한 0.45kb의 DNA 절편을 T

4 DNA 연결효소를 이용하여 결합시켰다. EcoR I과 BamH 1 효소에 의한 제한효소 지도확인을 통하여 테트라사이클린 항생제 내성 마커를 가지고 파 부위를 포함하며, tac 프로모터에 의하여 Opm A 선도서열과 뒤에 결합된 hEGF 유전자서열이 발현되도록 바르게 결합된 재조합 플라스미드임을 확인하고, 이를 pTE 105라고 명명하였다[참조: 제 6 도]. 이를 대장균 JM 101균주내로 하나한의 방법에 따라 형질전환시켰으며, 형질전환체를 DW/BT-2042로 명명하고, 1993년 4월 9일 국제기탁기관인 한국중균협회(KCCM)에 기탁번호KCCM-10027로 기탁되었다.

(실시에 7)형질전환체 hEGF의 발현pTE 105로 형질전환된 대장균 JM 101(DW/BT-2042; KCCM-10027)을 LB 배양배지에서 5시간 동안 진탕배양한 후, 최종농도가 1mM이 되도록 이소프로필 β-D-티오갈락토 피라노사이드(이하 IPTG 라함, Sigma I -6758)를 첨가하여 hEGF의 발현을 유도하였다. IPTG 첨가 후, 19시간 및 25시간 경과한 배양액을 각각 취하여 이를 원심분리하여 세포와 배양배지를 분리하였다. 15% 폴리아크릴아마이드겔 전기영동(H. Schagger et al., (1987) Anal. Biochem. 166, 368-379)을 수행한 결과, IPTG로 발현을 유도한 배양배지에서 시판하고 있는 표준 hEGF(Amersham, ARN 5100, UK)의 크기와 동일한 위치인 약 6,000달톤의 위치에서 많은 양의 단백질이 생성되는 것을 확인하였으며, 웨스턴 블로팅방법(W.N. Burnett(1981) Anal. Biochem. 112, 195-203)으로 이 단백질이 hEGF임을 확인하였다[참조: 제 7 도]. 제7도에서, 제1레인은 분자량 마커(Sigma, #MW-SDS-17S); 제2레인은 표준 hEGF(Amersham, #ARN 5100), 제3레인은 IPTG를 첨가하지 않은 24시간 배양액; 제4레인은 IPTG 첨가하지 않은 30시간 배양액; 제5레인은 IPTG 첨가한 24시간 배양액; 및, 제6레인은 IPTG 첨가한 30시간 배양액을 각각 나타낸다. 배양개시 후 24시간과 30시간 시료의 배양배지와 삼투충격(osmotic shock; T.Oka. et al., (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 7212-7216)을 가하여 페리플라즈름(periplasm)에 존재하는 단백질을 모은 시료중의 hEGF 양을 수용체 결합 분석법에 의해 분석한 결과, IPTG로 발현을 유도한 시료에서 배양 30시간후에는 약 343mg/L에 달하는 hEGF가 생성되는 것을 확인하였는데, 이는 공지된 어떠한 결과보다도 높은 hEGF 발현량을 나타내는 것이다. 배양 24시간과 30시간 후 배양액과 페리플라즈름에서의 hEGF의 양은 아래표 1과 같았다. 아울러, 이들 생산 hEGF의 대부분은 배양액으로 방출되는 것으로 확인되었다.

[표 1]

형질전환체	형질전환체	형질전환체
형질전환체	형질전환체	형질전환체
형질전환체	형질전환체	형질전환체
형질전환체	형질전환체	형질전환체

이상에서 상세히 설명하고 예시하였듯이, 본 발명은 대장균 내에서 인간 상피세포 성장인자의 발현을 최대화하도록 고안되고 제조된 발현벡터, 이를 대장균에 형질전환시킨 형질전환체 및 그로부터 hEGF를 고수율로 발현시켜 제조하는 방법을 제공한다.

(57)청구의 범위

청구항1

Omp A 선도서열-보편적인 번역 정지서열-trp A 전사 정지서열에 있어서, Omp A 선도서열과 보편적 번역 정지서열 사이에 hEGF를 코드화하는 유전자가 삽입된 발현 카세트를 포함하고, 이 발현 카세트는 tac 프로모터에 의하여 전사가 조절 가능하도록 제조된 인간 상피세포 성장인자 발현벡터 pTE 105(KCCM 10027).

청구항2

제1항에 있어서, 테트라사이클린 항생제 내성마커에 의해 선별되는 것을 특징으로 하는 인간 상피세포 성장인자 발현벡터 pTE 105.

청구항3

제1항에 있어서, pUC 19의 복제개시 부위와 복제조절 부위에 의해 복제되는 것을 특징으로 하는 인간 상피세포 성장인자 발현벡터 pTE 105.

청구항4

제1항에 있어서, 파(par) 부위에 의해서 대장균에서 안정화되는 것을 특징으로 하는 인간 상피세포 성장인자 발현벡터 pTE 105.

청구항5

제1항에 있어서, Omp A 선도서열과 보편적 번역 정지서열 사이에 Nae I과 Pst I 제한효소 부위를 가지는 것을 특징으로 하는 인간 상피세포 성장인자 발현벡터 pTE 105.

청구항6

제1항의 pTE 105 발현벡터로 형질전환된 대장균 JM 101(Escherichia coli JM 101; KCCM-10027).

청구항7

제1항의 발현벡터 pTE105로 형질전환된 미생물을 배양한 배양액으로부터 hEGF를 제조하는 방법.

도면

도면 1

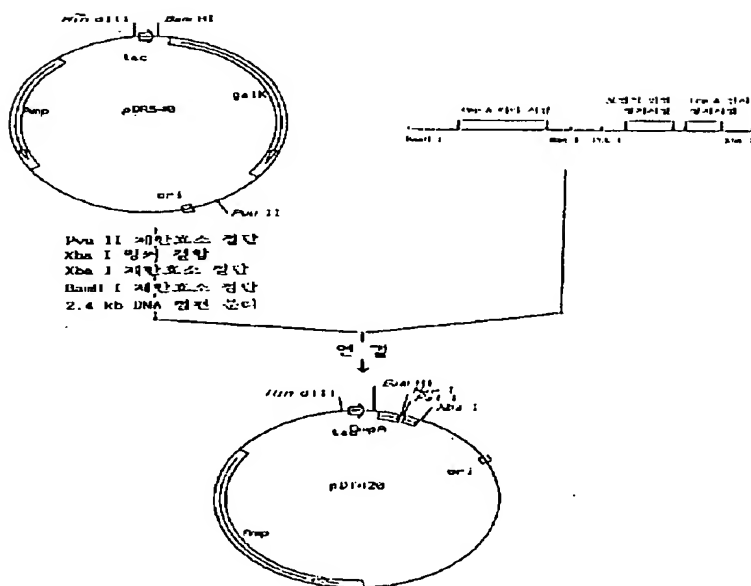
BsmI 1 OapA 리더 서열
 5' GATCCAAATTT ATG AAA AAG ACA GGT ATC GCG ATT GCA GTG
 3' GTTTTAA TAC TTT TTC TGT CGA TAG CGC TAA CGT CAC

Nae I
 GCA CTG GCT GGT TTC GCT ACC GTA GCG CAG GCG GGC
 CGT GAC CGA CCA AAG CGA TGG CAT CGC GTC CGG CGG

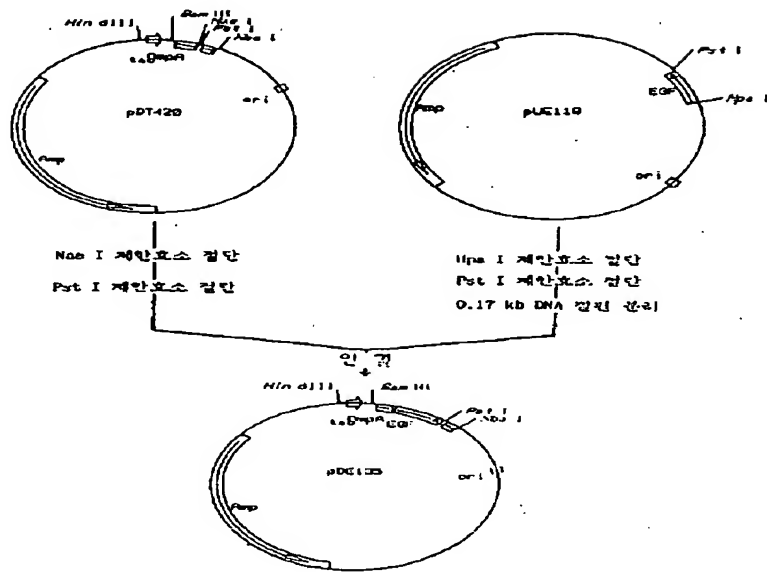
Pst I 번역 정지서열 TrpA 전사 정지
 CTC CAG CTT AAT TAA TTA AGC AGC CCG CCT AAT GAG
 GAC GTC GAA TTA ATT AAT TGG TCG GGC GGA TTA CTC

서열 Xba I
 CGG GCT TTT TTT T 3'
 GCC CGA AAA AAA AGA TC 5'

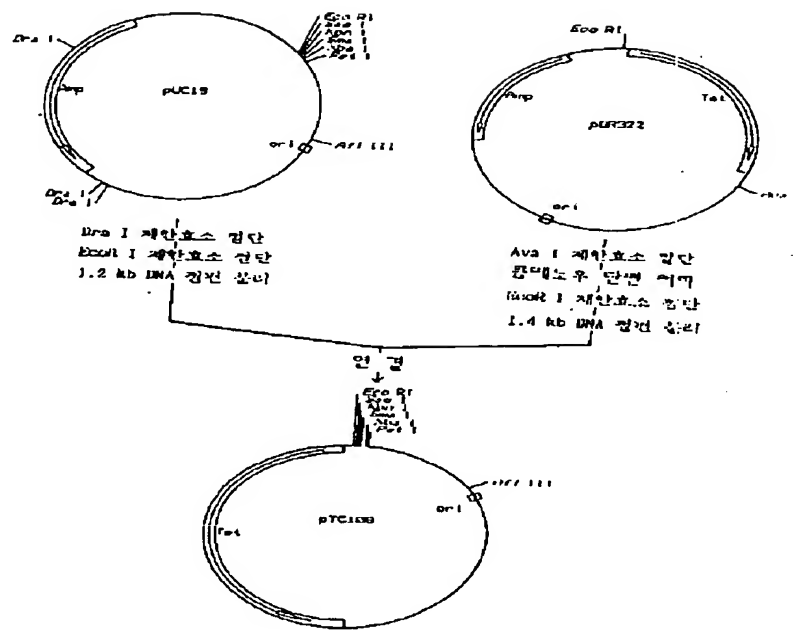
도면2



도면3

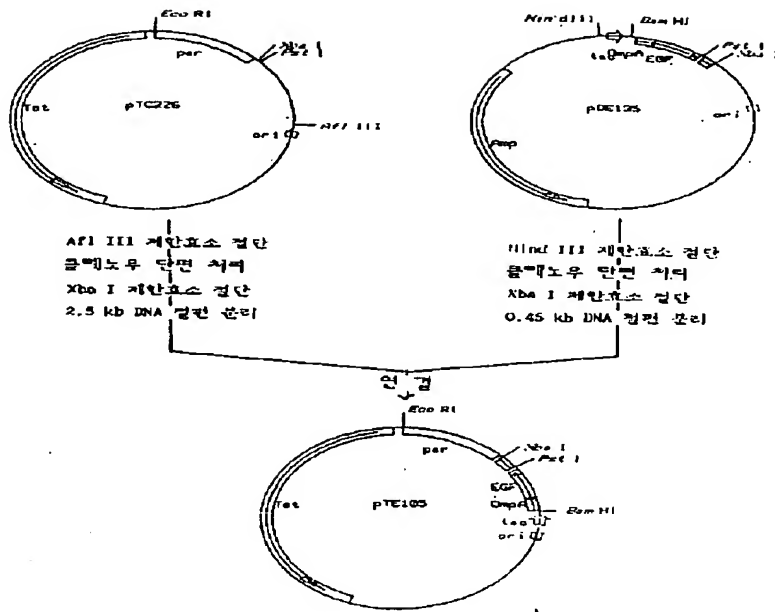


도면4

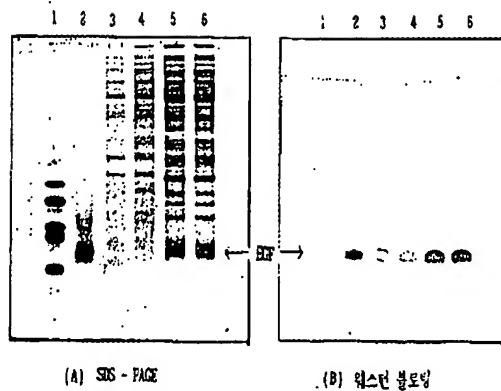


도면5





도 27



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.